

PCT/JP 00/03022

11.05.00

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

JP00/3022

REC'D 03 JUL 2000

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 5月11日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第130267号

出願人

Applicant(s):

財団法人 化学技術戦略推進機構  
工業技術院長

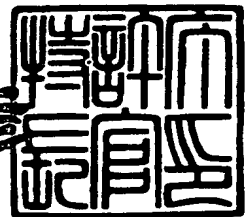
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 6月16日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3045025

【書類名】 特許願

【整理番号】 990888

【提出日】 平成11年 5月11日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C08G  
G01N

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東2丁目4番24-202号

【氏名】 吉廻 公博

【発明者】

【住所又は居所】 東京都品川区戸越1丁目15番18号

【氏名】 秋山 義勝

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県市川市国府台6丁目12番12号

【氏名】 岡野 光夫

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市広岡670-50

【氏名】 上野 勝彦

【特許出願人】

【持分】 066/100

【識別番号】 597071652

【氏名又は名称】 財団法人 化学技術戦略推進機構

【特許出願人】

【持分】 034/100

【識別番号】 000001144

【氏名又は名称】 工業技術院長 佐藤 壮郎

【代理人】

【識別番号】 100089705

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル2

06区 ユアサハラ法律特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 社本 一夫

【電話番号】 03-3270-6641

【代理関係の特記事項】 特許出願人 財団法人 化学技術戦略推進機構の  
代理人

【指定代理人】

【識別番号】 220000390

【氏名又は名称】 工業技術院物質工学工業技術研究所長 久保田 正明

【代理関係の特記事項】 特許出願人 工業技術院長 佐藤 壮郎の指定代  
理人

【復代理人】

【識別番号】 100089705

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル2  
06区 ユアサハラ法律特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 社本 一夫

【電話番号】 03-3270-6641

【代理関係の特記事項】 特許出願人 工業技術院長 佐藤 壮郎の復代理  
人

【選任した代理人】

【識別番号】 100071124

【弁理士】

【氏名又は名称】 今井 庄亮

【代理関係の特記事項】 特許出願人 財団法人 化学技術戦略推進機構  
の代理人

【選任した代理人】

【識別番号】 100076691

【弁理士】

【氏名又は名称】 増井 忠式

【代理関係の特記事項】 特許出願人 財団法人 化学技術戦略推進機構  
の代理人

【選任した代理人】

【識別番号】 100075236

【弁理士】

【氏名又は名称】 栗田 忠彦

【代理関係の特記事項】 特許出願人 財団法人 化学技術戦略推進機構  
の代理人

【選任した代理人】

【識別番号】 100075270

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 泰

【代理関係の特記事項】 特許出願人 財団法人 化学技術戦略推進機構  
の代理人

【選任した代理人】

【識別番号】 100096013

【弁理士】

【氏名又は名称】 富田 博行

【代理関係の特記事項】 特許出願人 財団法人 化学技術戦略推進機構  
の代理人

【選任した復代理人】

【識別番号】 100071124

【弁理士】

【氏名又は名称】 今井 庄亮

【代理関係の特記事項】 特許出願人 工業技術院長 佐藤 壮郎の復代  
理人

【選任した復代理人】

【識別番号】 100076691

【弁理士】

【氏名又は名称】 増井 忠式

【代理関係の特記事項】 特許出願人 工業技術院長 佐藤 壮郎の復代理人

【選任した復代理人】

【識別番号】 100075236

【弁理士】

【氏名又は名称】 栗田 忠彦

【代理関係の特記事項】 特許出願人 工業技術院長 佐藤 壮郎の復代理人

【選任した復代理人】

【識別番号】 100075270

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 泰

【代理関係の特記事項】 特許出願人 工業技術院長 佐藤 壮郎の復代理人

【選任した復代理人】

【識別番号】 100096013

【弁理士】

【氏名又は名称】 富田 博行

【代理関係の特記事項】 特許出願人 工業技術院長 佐藤 壮郎の復代理人

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 13,860円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 刺激応答性高分子を用いた親和力制御型材料および該材料を用いた分離精製方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 物理的刺激により化学的あるいは物理的な環境変化を起こすことで、標的物質の親和性物質における親和力が溶液中で可逆的に変化することを特徴とする親和力制御型材料。

【請求項 2】 温度以外の条件のうち少なくとも 1 つの条件を一定にしたまま、標的物質の親和性物質における親和力を物理的刺激で可逆的に変化させることを特徴とする請求項 1 記載の親和力制御型材料。

【請求項 3】 物理的刺激が温度変化であることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の親和力制御型材料。

【請求項 4】 刺激応答性高分子と標的物質の親和性物質がそれぞれ独立して支持体に共有結合していることを特徴とする請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の親和力制御型材料。

【請求項 5】 支持体と標的物質の親和性物質を結合するスペーサーの長さあるいは刺激応答性高分子の大きさにより標的物質の結合能力を制御することを特徴とする請求項 1～4 のいずれか 1 項記載の親和力制御型材料。

【請求項 6】 側鎖にエポキシ基を有するモノマーを原料として膜乳化法と酸性物質あるいは塩基性物質で化学処理する方法で製造した粒子径均一親水性多孔質ポリマー粒子を支持体とすることを特徴とする請求項 1～5 のいずれか 1 項記載の親和力制御型材料。

【請求項 7】 クロマトグラフィー用充填剤として利用することを特徴とする請求項 1～6 のいずれか 1 項記載の親和力制御型材料。

【請求項 8】 請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載された親和力制御型材料による標的物質の分離精製法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、物理的刺激による刺激応答性高分子の化学的あるいは物理的な環境変化により、溶液中で標的物質の親和性物質の親和力を可逆的に制御することが可能な親和力制御型材料に関する。なお、本発明において、「溶液」とは水、緩衝液、有機溶媒と水との混合溶液、緩衝液と有機溶媒との混合溶液などを意味し、有機溶媒としては水と混合するものであれば良く、例えば、アルコール、アセトニトリル、テトラヒドロフラン等が挙げられる。さらに、本発明は、金属イオン、医薬品、生体成分などの標的物質を分離精製する親和力制御型分離材料に関する。さらに、本発明は、温度以外の条件（例えば、溶液中のpHまたは有機溶媒もしくは塩などの濃度）のうち少なくとも1つの条件を一定にしたまま、かかる親和力制御型分離材料により金属イオン、医薬品、生体成分などの標的物質を分離精製する方法に関する。

#### 【0002】

##### 【従来の技術】

生体成分、医薬品などの分離精製には、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどが有効な手段として用いられている。さらに、近年バイオテクノロジー技術の発展に伴い、組み換えタンパク質などの新規な生理活性物質が多数開発され、その生理活性を失わない分離精製方法が求められている。

#### 【0003】

しかし、従来のクロマトグラフィーにより生理活性物質などの分離精製を行う場合、移動相に有機溶媒を添加する、移動相の塩濃度を高くする、あるいは移動相のpHを変化するなどの操作が必要であり、これらの従来の操作が生理活性物質の失活の原因となっていた。また、従来のクロマトグラフィーにより活性を保持したまま生理活性物質を分離精製することができたとしても、移動相に添加した有機溶媒あるいは塩などを除去する操作が必要であり、これにより標的となる生理活性物質の回収率が低下する問題点があった。

#### 【0004】

一方、クロマトグラフィー充填剤の支持体としてシリカゲルあるいはポリスチレン粒子、ポリメタクリレート粒子をはじめとするポリマー粒子が多く用いられ



ている。しかし、シリカゲルはシラノール基のためにタンパク質が非特異的に吸着して、分離精製後のタンパク質の収率が著しく低下する問題があった。ポリマー粒子は大きな細孔径とシラノール基などのイオン交換基の不在により、タンパク質の分離精製の支持体として適していることが知られている。

#### 【0005】

しかし、ポリスチレン粒子、ポリメタクリレート粒子はそれ自身で高い疎水性を有しているので、アフィニティークロマトグラフィーなどの支持体として用いる場合には、タンパク質の疎水的な吸着を妨げるために支持体を親水性化する必要がある。さらに、分離精製における充填剤の性能を高くするためには、粒子径をそろえることが考えられ、粒子径のそろった親水性な支持体が求められているものの、その製造法はあまり多くないのが実状である。

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、上記のような現状に鑑み、タンパク質との非特異的吸着を抑え分離性能の高い支持体を利用して、温度以外の条件（例えば、溶液中のpHまたは有機溶媒もしくは塩などの濃度）のうち少なくとも1つの条件を一定にしたまま、物理的刺激で生理活性物質などの標的物質を分離精製する親和力制御型材料およびかかる親和力制御型材料を用いた標的物質の分離精製法を提供することである。

#### 【0007】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者は、鋭意研究の結果、刺激応答性高分子および標的物質の親和性物質をそれぞれ独立して支持体に共有結合することで親和力制御型材料を合成できることを見出した。また、本発明者は、かかる親和力制御型材料に標的物質を吸着させた後、温度以外の条件（例えば、溶液中のpHまたは有機溶媒もしくは塩などの濃度）のうち少なくとも1つの条件を一定にしたまま、温度変化による物理的刺激により標的物質を脱着できることを見出した。また、本発明者は、支持体と標的物質の親和性物質を結合するスペーサーの長さ、あるいは支持体に結合する刺激応答性高分子の大きさが標的物質の結合能力を制御することを見出した。

また、本発明は、側鎖にエポキシ基を有するモノマーを原料として膜乳化法と酸性物質あるいは塩基性物質で化学処理する方法で製造した粒子径均一親水性多孔質ポリマー粒子を支持体として利用することを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

#### 【0008】

すなわち、本発明は、温度をはじめとする物理的刺激により標的物質の親和性物質における親和力が溶液中で可逆的に変化することを特徴とする親和力制御型材料に関する。

#### 【0009】

さらに、本発明は、温度以外の条件（例えば、溶液中のpHまたは有機溶媒もしくは塩などの濃度）のうち少なくとも1つの条件を一定にしたまま、物理的刺激で刺激応答性高分子の化学的あるいは物理的な環境を変化させることにより、標的物質の親和性物質における親和力を可逆的に変化させることを特徴とする親和力制御型材料に関する。

#### 【0010】

さらに、本発明は、刺激応答性高分子と標的物質の親和性物質がそれぞれ独立して支持体に共有結合していることを特徴とする親和力制御型材料に関する。

さらに、本発明は、支持体と標的物質の親和性物質を結合するスペーサーの長さ、あるいは刺激応答性高分子の大きさにより標的物質の結合能力を制御することを特徴とする親和力制御型材料に関する。

#### 【0011】

さらに、本発明は、側鎖にエポキシ基を有するモノマーを原料として膜乳化法と酸性物質あるいは塩基性物質で化学処理する方法で製造した粒子径均一親水性多孔質ポリマー粒子を支持体とする親和力制御型材料に関する。

#### 【0012】

さらに、本発明は、かかる親和力制御型材料をクロマトグラフィー用充填剤として利用することに関する。

さらに、本発明は、かかる親和力制御型材料による標的物質の分離精製法に関する。

## 【0013】

## 【発明の実施の形態】

本発明における物理的刺激とは、例えば温度である。

本発明の親和力制御型材料は、例えば、刺激応答性高分子あるいはその共重合体を支持体に共有結合した後に、標的物質の親和性物質を支持体に共有結合する方法、あるいは標的物質の親和性物質を支持体に共有結合した後に、刺激応答性高分子あるいはその共重合体を支持体に共有結合する方法、あるいは標的物質の親和性物質と、刺激応答性高分子あるいはその共重合体を同時に支持体にそれぞれ共有結合する方法などで製造することができる。

## 【0014】

支持体とは、例えば、シリカゲル、ポリメタクリレート粒子、ポリスチレン粒子、ポリビニルアルコール粒子、セルロースゲル、デキストランゲル、アガロースゲル、ポリアクリルアミドゲルなどが挙げられ、溶媒に不溶であり、刺激応答性高分子および標的物質の親和性物質と共有結合可能な反応性官能基を有しており、標的物質と相互作用しない支持体が望ましい。特に、膜乳化法と酸性物質あるいは塩基性物質で化学処理する方法で製造した粒子径均一親水性多孔質ポリマー粒子を支持体として用いることが望ましい。

## 【0015】

本発明において用いる膜乳化法とは、混合しない一方の液体を加圧して多孔質ガラス膜に透過することにより、他方の液体中で粒子径均一粒子を調製することを特徴とする方法である。なお、膜乳化法については、たとえば、S. Omi, K. Katami, A. Yamamoto, and M. Iso, J. Appl. Polym. Sci., 51 (1994) 1-11に記載されている。

## 【0016】

本発明の支持体は次のようにして製造される。ポリマー粒子の原料となるモノマーと希釈剤などの混合溶液を調製し、多孔質ガラスの片側に先の混合溶液を滴たして加圧する。多孔質ガラス膜の反対側に安定剤などの溶解した水溶液を滴たしておくことで、粒子径均一粒子からなるエマルションが得られる。その後加熱などにより重合を行うことで、粒子径が均一なラテックス粒子が調製される。さ

らに、このラテックス粒子を酸性物質あるいは塩基性物質の溶液中で攪拌することで、支持体となる粒子径均一親水性多孔質ポリマー粒子が調製される。また、酸性物質あるいは塩基性物質で化学処理することによって、アミノ基などの反応性官能基を本発明の支持体に導入することができるので、その反応性官能基を利用して、刺激応答性高分子あるいは標的物質の親和性物質などを固定化することができる。

#### 【0017】

本発明の粒子径均一親水性多孔質ポリマー粒子の製造に用いられるモノマーとして、アクリル酸グリシジル、メタクリル酸グリシジル、ジアクリル酸エステル（例えば、ジアクリル酸エチレン）、ジメタクリル酸エステル（例えば、ジメタクリル酸エチレン）、グリシジルビニルベンジルエーテル、ジビニルベンゼン等を挙げる事ができる。また、これらのモノマーを任意に組み合わせることもできる。

#### 【0018】

本発明の粒子径均一親水性多孔質ポリマー粒子の製造に用いられる希釈剤としては、重合しない化合物であれば良く、トルエンなどの芳香族化合物、ドデカンなどの脂肪族化合物などを挙げる事ができる。

#### 【0019】

本発明の粒子径均一親水性多孔質ポリマー粒子の製造に用いられる酸性物質あるいは塩基性物質として、硫酸、塩酸、硝酸、酢酸、水酸化ナトリウム、アンモニア、1, 6-ジアミノヘキサンをはじめとする脂肪族ジアミンなどを挙げる事ができる。

#### 【0020】

本発明において用いる刺激応答性高分子としては、例えば、ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）をはじめとするポリ（N-置換アクリルアミド）、ポリ（N-イソプロピルメタクリルアミド）をはじめとするポリ（N-置換メタクリルアミド）、ポリ（N, N-二置換アクリルアミド）、ポリ（N, N-二置換メタクリルアミド）、ポリメチルビニルエーテル、ポリ（エチレンオキシド-プロピレンオキシド）共重合体、部分けん化ポリビニルアルコールをはじめとするポ

リビニルアルコール誘導体、メチルセルロースをはじめとするセルロース誘導体などが挙げられる。また、刺激応答性高分子を支持体に共有結合するために、刺激応答性高分子にアミノ基、カルボキシル基、水酸基などの反応性官能基を導入することもできる。

#### 【0021】

本発明において用いる標的物質の親和性物質としては、チバクロンブルー F3 G-A（商品名；Fluka（社）製）をはじめとする色素、イミノニ酢酸、グルコースをはじめとする糖鎖、ヘパリン、レクチンをはじめとするタンパク質、ビオチン、ベンズアミジン、リジン、アルギニン、ペプチド、DNAなどが挙げられる。また、標的物質の結合能力を制御するために、アルキル基、エチレンオキシド基などのスペーサーを介して支持体と標的物質の親和性物質を共有結合することもできる。

#### 【0022】

本発明の標的物質の分離精製法としては、例えば、かかる親和力制御型材料をクロマトグラフィー用充填剤として用いたクロマトグラフィーが考えられる。また、標的物質がかかる親和力制御型材料の標的物質の親和性物質と結合する温度で標的物質と不純物質を分離した後、温度を変化させることでかかる親和力制御型材料の刺激応答性高分子の環境を変化させて、標的物質を溶出させることもできる。

#### 【0023】

##### 【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれによって何ら限定されるものではない。

#### 【0024】

##### 【実施例 1】

##### 1) 刺激応答性高分子の合成

N-イソプロピルアクリルアミド（20 g）、3-メルカプトプロピオン酸（0.18 g）、および 2, 2'-アゾビス（4-シアノ吉草酸）（0.27 g）をテトラヒドロフラン（200 mL）に溶解し、重合管に入れた。溶液中の酸素

は凍結融解脱気法により除いた。重合は60℃で2時間行い、再沈殿溶媒としてジエチルエーテルを用いることで片末端にカルボキシル基を有するポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）を合成した。

#### 【0025】

分子量の測定はGPC（ゲル浸透クロマトグラフィー）と末端基定量法を用いた。GPCでは、移動相として10 mM臭化リチウムを含むジメチルホルムアミド、カラムとして $\alpha$ -3000（東ソー株式会社製）、標準物質としてポリスチレンを用いたところ、数平均分子量約4500、重量平均分子量約10000のポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）であった。末端基定量法では、0.01規定の水酸化ナトリウム水溶液を用いて合成したポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）のカルボキシル基を求めたところ、その数平均分子量が約5000であった。合成したポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）の数平均分子量が、GPCおよび末端基定量法のそれぞれの方法でほぼ一致したことを確認した。

#### 【0026】

合成したポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）（10 g）、N-ヒドロキシこはく酸イミド（0.25 g）、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド（0.45 g）をテトラヒドロフラン（60 mL）に溶解し、室温で12時間攪拌した。析出物をろ取した後、再沈殿溶媒としてジエチルエーテルを用いて、片末端のカルボキシル基をN-ヒドロキシこはく酸イミドでエステル化したポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）を合成した。

#### 2) 粒子径均一親水性多孔質ポリマー粒子の合成

メタクリル酸グリシジル（3.1 mL）、ジメタクリル酸エチレン（1.9 mL）、トルエン（7.1 mL）そしてドデカン（0.4 mL）を原料として、平均細孔径1.95  $\mu$ mのMPGパイプを通して加圧により2 wt %のポリビニルアルコール水溶液中に原料を押し出すことでW/Oエマルションを調製した。重合は70℃で6時間行い、粒子径のそろったラテックス粒子を高収率で合成した。このラテックス粒子の平均粒子径は12.5  $\mu$ m、CV値は12.4%であり、粒子径がそろっていることを確認した。さらに、合成したラテックス粒子（3.5 g）を1, 6-ヘキシルジアミン（1.8 g）を含む水溶液（160 mL）

に分散させて30℃で2時間攪拌した。

#### 【0027】

1, 6-ヘキシルジアミンで処理する前のラテックス粒子表面には、エポキシ基が3.1 mmol/g存在しており、1, 6-ヘキシルジアミンで処理した粒子径均一親水性多孔質ポリマー粒子の表面には0.36 mmol/gのアミノ基が導入されたことを、それぞれ塩酸-塩化カルシウム法、モール法で求めた。

#### 【0028】

さらに、1, 6-ヘキシルジアミンで処理した粒子径均一親水性多孔質ポリマー粒子(3.5 g)を無水酢酸10 mL中で攪拌して、表面のアミノ基をアセチル化し、アミド化粒子を合成した。このアミド化粒子は、20 mMリン酸緩衝液(pH 7.0)の移動相では牛血清アルブミン(BSA)を吸着しなかった。このことから、この粒子径均一親水性多孔質ポリマー粒子は、アフィニティークロマトグラフィーなどのタンパク質を分離するクロマトグラフィー担体として有用な親水性を有していることを明らかにした。

#### 3) ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)の支持体への固定化

1, 6-ヘキシルジアミンで処理した粒子径均一親水性多孔質ポリマー粒子(4.5 g)、片末端のカルボキシル基をN-ヒドロキシこはく酸イミドでエステル化したポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(4.5 g)、そしてアセトニトリル(75 mL)を室温で12時間攪拌した。アセトニトリル、テトラヒドロフラン、メタノール、アセトンで洗浄した後、室温で乾燥した。元素分析により、支持体である粒子径均一親水性多孔質ポリマー粒子に3.4 wt%のポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)が固定化されたことを確認した。さらに、温度による親和力制御能を比較するために、支持体に残存しているアミノ基を無水酢酸でアセチル化した充填剤(n o C B)も合成した。

#### 4) チバクロンブルーF3G-Aの支持体への固定化

ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を固定化した支持体(0.70 g)、1, 3-ブタジエンジエポキシド(0.09 mL)あるいはエチレングリコールジグリシジルエーテル(0.21 g)、そしてアセトニトリル(10 mL)を30℃で1時間攪拌することで、支持体に残存しているアミノ基とスペーサーと

なるジエポキシド化合物の一方のエポキシ基を反応させた。その懸濁液に無水酢酸 (0.11 mL) を加えて 30℃ で 1 時間攪拌することで、支持体の未反応アミノ基をアセチル化した。ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) およびスペーサーをそれぞれ固定化した支持体をアセトニトリル、アセトンで洗浄した後、室温で乾燥した。

#### 【0029】

ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) およびスペーサーをそれぞれ固定化した支持体 (0.61 g)、アミノヘキシル化チバクロンブルー F3G-A (0.89 g)、水 (10 mL) を加え、水酸化ナトリウムで pH 11 に調整した後、25℃ で 3 時間攪拌して、ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) とチバクロンブルー F3G-A をそれぞれ支持体に固定化した充填剤を合成した。チバクロンブルー F3G-A の固定化量は滴定により求め、スペーサーとして 1, 3-ブタジエンジエポキシドを用いた充填剤 (CB-4) は  $21 \mu\text{mol/g}$ 、スペーサーとしてエチレングリコールジグリシジルエーテル (CB-10) を用いた充填剤は  $12 \mu\text{mol/g}$  であった。

#### 【0030】

##### 【実施例 2】

##### 1) 充填剤の充填

noCB、CB-4 および CB-10 は水による湿式充填剤により、内径 4.6 mm、長さ 30 mm のステンレススチール製カラムにそれぞれ充填した。

##### 2) BSA に対する吸着量の測定

移動相として pH 5 のクエン酸緩衝液 ( $I = 0.01$ ) を用い、20℃ を基準として 40℃ におけるそれぞれの充填剤の吸着量を破か曲線で求めた。その結果を表 1 に示す。

#### 【0031】



【表 1】

充填剤	充填剤 1 g 当たりの BSA 吸着量
no CB	6.7 $\mu$ g
CB-4	23.4 $\mu$ g
CB-10	73.8 $\mu$ g

## 【0032】

CB-4 と比較して CB-10 で BSA の吸着量が大きくなっている。これは、支持体とチバクロンブルー F3G-A との間のスパーサー長さが BSA の吸着量に影響していることを示している。また、支持体に結合したポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）は、BSA の吸着に大きく影響しないことも示している。

## 3) アフィニティークロマトグラフィーを用いた温度変化による親和力制御

CB-10 を用いて、40℃で BSA を充填剤のリガンドであるチバクロンブルー F3G-A に吸着させた後に、20℃に温度を変化させることで刺激応答性高分子の構造を変化させて、リガンドから BSA が脱着して溶出されることを確認した。その結果を図 1 に示す。移動相として pH 5 のクエン酸緩衝液（I=0.01）を用い、40℃で BSA（111  $\mu$ g）を CB-10 に負荷した。マイクロ BCA 法で溶出液中の BSA の量を測定した。過剰量の BSA が 1~4 mL の溶出液量で溶出した。溶出液量が 6 mL まで 40℃で移動相を流して BSA の溶出が確認されなくなった後、移動相を止めて 20℃で 20 分間冷却した。20℃のまま移動相を再び流したところ、支持体に結合しているポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）の構造変化により、40℃でリガンドに吸着した BSA が脱着してカラムから溶出した（溶出液量 7~9 mL）。また、この温度変化で溶出した BSA の量は、CB-10 の BSA に対する吸着量の 90% であった。このように、刺激応答性高分子と標的物質の親和性物質をそれぞれ支持体に共有結合した材料を用いることで、標的物質と標的物質の親和性物質との間の親和力が温度のような物理的刺激により制御でき、そして標的物質の分離精製法に応用できることが明らかとなった。

【0 0 3 3】

【発明の効果】

本発明における親和力制御型材料は以下のような利点を有する。

- 1) 標的物質の分離精製において化学的に過酷な溶出条件を用いる必要がないので、生理活性物質などの活性あるいは回収率を従来の分離精製法よりも大きく改善できる。
- 2) 標的物質の親和性物質および刺激応答性高分子が支持体に共有結合しているので、これらが剥離して分離精製を妨げることがない。
- 3) アフィニティークロマトグラフィー充填剤として用いた場合、充填剤の再生が従来の担体よりも速やかに行うことができる。
- 4) 従来のアフィニティークロマトグラフィー充填剤では不可能であった多種類の標的物質の分離精製が可能となる。

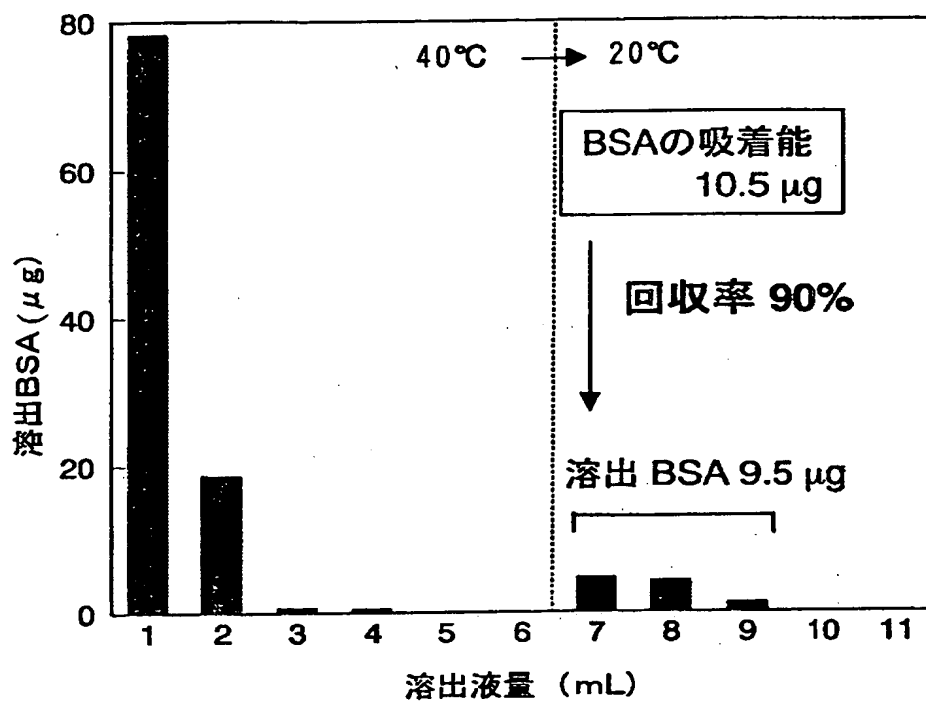
【図面の簡単な説明】

【図 1】

温度変化による B S A の親和力制御を B C - 1 0 で行ったときのクロマトグラムである。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 タンパク質との非特異的吸着を抑え分離性能の高い支持体を利用して、温度以外の条件（例えば、溶液中のpHまたは有機溶媒もしくは塩などの濃度）のうち少なくとも1つの条件を一定にしたま、物理的刺激で生理活性物質などの標的物質を分離精製する親和力制御型材料およびかかる親和力制御型材料を用いた標的物質の分離精製法を提供すること。

【解決手段】 温度変化等の物理的刺激により化学的あるいは物理的な環境変化を起こすことで、標的物質の親和性物質における親和力が水溶液中で可逆的に変化することを特徴とする親和力制御型材料を用いる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第130267号
受付番号	59900442449
書類名	特許願
担当官	清水 スズ子 1350
作成日	平成11年 6月29日

<認定情報・付加情報>

【手数料の表示】

【納付金額】 21,000円

【特許出願人】

【識別番号】 597071652

【住所又は居所】 東京都台東区柳橋2丁目22番13号

【氏名又は名称】 財団法人 化学技術戦略推進機構

【特許出願人】

【識別番号】 000001144

【住所又は居所】 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

【氏名又は名称】 工業技術院長

【代理人】

申請人

【識別番号】 100089705

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所

【氏名又は名称】 社本 一夫

【指定代理人】

【識別番号】 220000390

【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1

【氏名又は名称】 工業技術院物質工学工業技術研究所長

【復代理人】

申請人

【識別番号】 100089705

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所

【氏名又は名称】 社本 一夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100071124

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所

次頁有

認定・付加情報（続き）

【氏名又は名称】	今井 庄亮
【選任した代理人】	
【識別番号】	100076691
【住所又は居所】	東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所
【氏名又は名称】	増井 忠弼
【選任した代理人】	
【識別番号】	100075236
【住所又は居所】	東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所
【氏名又は名称】	栗田 忠彦
【選任した代理人】	
【識別番号】	100075270
【住所又は居所】	東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所
【氏名又は名称】	小林 泰
【選任した代理人】	
【識別番号】	100096013
【住所又は居所】	東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所
【氏名又は名称】	富田 博行
【選任した復代理人】	
【識別番号】	100071124
【住所又は居所】	東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所
【氏名又は名称】	今井 庄亮
【選任した復代理人】	
【識別番号】	100076691
【住所又は居所】	東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所
【氏名又は名称】	増井 忠弼
【選任した復代理人】	
【識別番号】	100075236
【住所又は居所】	東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所

次頁有

認定・付加情報（続き）

【氏名又は名称】	栗田 忠彦
【選任した復代理人】	
【識別番号】	100075270
【住所又は居所】	東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町 ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所
【氏名又は名称】	小林 泰
【選任した復代理人】	
【識別番号】	100096013
【住所又は居所】	東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町 ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所
【氏名又は名称】	富田 博行

次頁無

【書類名】 手続補正書

【提出日】 平成11年 6月10日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成11年特許願第130267号

【補正をする者】

【識別番号】 597071652

【氏名又は名称】 財団法人 化学技術戦略推進機構

【補正をする者】

【識別番号】 000001144

【氏名又は名称】 工業技術院長 佐藤 壮郎

【代理人】

【識別番号】 100089705

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル2  
06区 ユアサハラ法律特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 社本 一夫

【電話番号】 03-3270-6641

【代理関係の特記事項】 特許出願人 財団法人 化学技術戦略推進機構の  
代理人

【復代理人】

【識別番号】 100089705

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル2  
06区 ユアサハラ法律特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 社本 一夫

【電話番号】 03-3270-6641

【代理関係の特記事項】 特許出願人 工業技術院長 佐藤 壮郎の復代理  
人



【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 持分契約書

【補正方法】 追加

【補正の内容】

【提出物件の目録】

【物件名】 持分契約書 1

299:0900198



# 持 分 契 約 書

平成11年5月17日

事件の表示 平成11年 5月// 日付特許願

整理番号 990888

(発明の名称：刺激応答性高分子を用いた親和力制御型材料および該材料を用いた分離精製方法)

上記発明の特許を受ける権利の持分を甲34%、乙66%と定めたことに相違ありません。

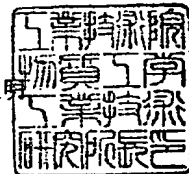
(甲) 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

工業技術院長 佐藤 壮郎

指定代理人

茨城県つくば市東1丁目1番

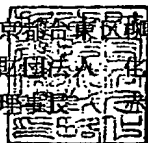
工業技術院物質工学工業技術研究所長 久保田 正男



(乙) 東京都台東区柳橋2丁目22番13号

財団法人 化学技術戦略推進機構

理事長 赤池 俊光



工業技術院職務発明規程・工業技術院共同研究規程等により持分の決定は工業技術院長に代わり指定代理人である各研究所長が行う旨規程している。

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第130267号
受付番号	29910900198
書類名	手続補正書
担当官	清水 スズ子 1350
作成日	平成11年 8月 3日

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】

【識別番号】	597071652
【住所又は居所】	東京都台東区柳橋2丁目22番13号
【氏名又は名称】	財団法人 化学技術戦略推進機構

【補正をする者】

【識別番号】	000001144
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関1丁目3番1号
【氏名又は名称】	工業技術院長

【代理人】

申請人

【識別番号】	100089705
【住所又は居所】	東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町 ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所

【氏名又は名称】	社本 一夫
----------	-------

【復代理人】

申請人

【識別番号】	100089705
【住所又は居所】	東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町 ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所

【氏名又は名称】	社本 一夫
----------	-------

【提出された物件の記事】

【提出物件名】	持分契約書 1
---------	---------

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [597071652]

1. 変更年月日 1998年 3月26日

[変更理由] 名称変更

住 所 東京都台東区柳橋2丁目22番13号

氏 名 財団法人 化学技術戦略推進機構

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001144]

1. 変更年月日 1990年 9月20日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

氏 名 工業技術院長

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**